

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462565

研究課題名(和文)精子と子宮内膜の相互作用の解明と新たな着床障害の治療応用に関する研究

研究課題名(英文)The elucidation of sperm on endometrial function and clinical application to implantation failure

研究代表者

河野 康志 (Kawano, Yasushi)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40274758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜における精子を介したprotease-activated receptor (PAR)-2の細胞内情報伝達系に注目した。子宮内膜間質細胞ならびに上皮細胞において精子ならびにPAR-2 tetherd ligandの添加でERK-1/2、p38、JNK等のMAP kinase のリン酸化ならびにGSK-3の活性化が確認され、PAR-2 antagonistの添加でリン酸化が抑制された。子宮内膜間質細胞ならびに上皮細胞において、精子はPAR-2を介してMAP kinaseを活性化し、生理活性物質の産生調節に関与し、着床機構に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of sperm on endometrial function, the kinase activation via protease-activated receptor (PAR)-2 in endothelial epithelial cells (EECs) and endometrial stromal cells (ESCs) were investigated. Following stimulation by sperm and the PAR-2 agonist, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity such as extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2, p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK), and glycogen synthase kinase (GSK)-3 were activated, and these signals were inhibited by the PAR-2 antagonist. From our data, the results suggest that sperm induces activation of the MAPK system via PAR-2, leading to the modulation of endometrial function.

研究分野：生殖内分泌学会

キーワード：子宮内膜 着床

1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療における体外受精・胚移植の妊娠率は約20～30%であり。良好胚を移植しても着床しない、いわゆる着床障害症例が存在する。胚盤胞は正常月経周期では20日目から24日目(day LH+7 からday LH+11)に着床し、子宮内膜が胚を受け入れられる期間は限られている。この期間をimplantation windowといい、初期胚が胚盤胞へと分化するのに同調するように排卵後より分泌期にかけて子宮内膜の分化も起こる。臨床的には、凍結融解胚移植時に精子を子宮内に入れたのち、胚移植を行うと、妊娠率が有意に増加したという報告がある(Geva et al., Fertil Steril, 2000)。実際には凍結融解胚移植による着床においては精子が子宮内膜に存在することがないが、精子の存在が妊娠に影響をおよぼすと仮定した場合には、精子が子宮内膜の成熟や着床に何らかの役割を演じている可能性が示唆される。

2. 研究の目的

子宮内膜において女性ホルモンや黄体ホルモンによって活性化される様々な酵素や細胞内情報伝達系が子宮内膜の形態学および機能的分化にどのような役割を演じているかについて検討した。また、精子と子宮内膜の相互作用を検討する目的で、精子を添加した時にprotease-activated receptor (PAR)-2を介する生理活性物質の産生調節に注目し、細胞内伝達系について網羅的解析を行った。さらに、ターゲットとなる細胞内情報伝達系が、妊娠維持や流産および不育症などの生殖現象にどのように関わっているかを調べ、不妊症の治療に結びつけることが可能かどうかを検討し、新たな着床障害の治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

1) 正常子宮内膜組織の採取

子宮筋腫に対する子宮全摘出術時に、患者より文書による同意を得て正常子宮内膜組織を

採取した。なお、本事業の内容を含む一連の研究は、平成16年6月に大分大学医学部ヒトゲノム研究倫理審査委員会に基づく許可を受けている。採取した組織より、蛋白を抽出した。

2) 子宮内膜上皮細胞ならびに間質細胞の分離、培養

上述の方法で採取した子宮内膜組織より我々がこれまで行ってきた方法で子宮内膜上皮細胞ならびに間質細胞を分離、培養した。これらのprimary cultureによる細胞を用いて、in vitroの実験を行った。

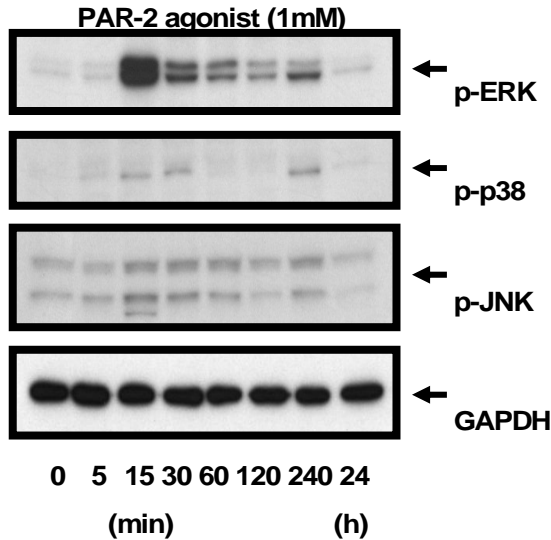
3) 細胞内情報伝達系のアレイによる細胞内活性化酵素の網羅的解析

ボランティアから得られた精子を添加後、培養し、正常子宮内膜から抽出した蛋白を用いて、アレイにより細胞内情報伝達系に関連したリン酸化酵素を網羅的解析することにより細胞内で活性化する酵素を解析した。

4. 研究成果

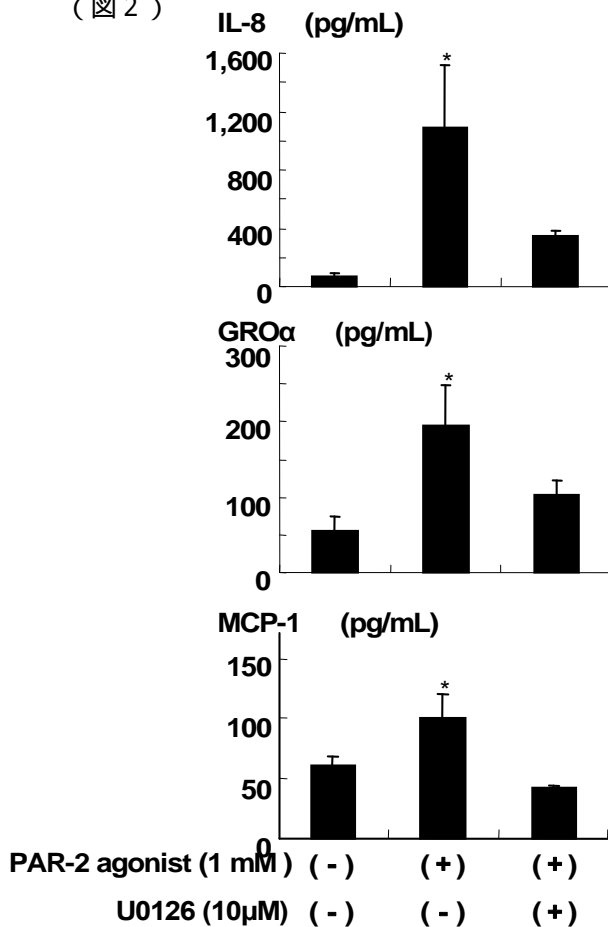
1) 子宮内膜間質細胞を培養し、PAR-2のtethered ligandを添加したところ、PAR-2を介してmitogen-activated protein kinase (MAPK)であるERK、p38およびJNKの時間依存的なリン酸化が認められ、特にERKは特に強いリン酸化がみられた(図1)。また、これらの酵素は、それぞれ特異的な阻害剤の添加でリン酸化が抑制された。一方、MAPKの下流にある翻訳関連蛋白である4E-BP-1、p70S6 kinaseおよびS6 ribosomal proteinもPAR-2を介して時間依存性に活性が認められた。これらの蛋白質は、MAPKのそれぞれ特異的な阻害剤の添加でその活性化が抑制された。

(図 1)



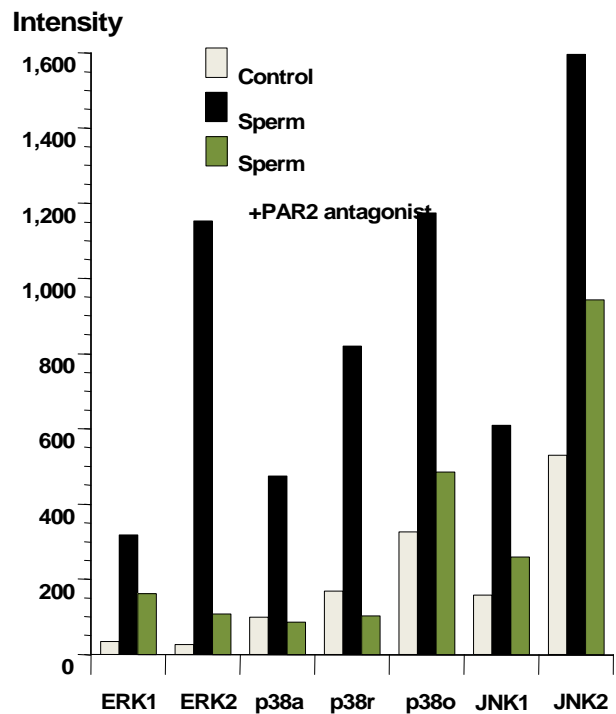
2)培養上清中のケモカイン(interleukin-8、 growth-regulated oncogene 、 monocyte-chemoattractant protein-1) を ELISA法を用いて定量したところ、 PAR-2を介して産生量が増加した(図 2)。次に、それぞれ特異的な阻害剤をPAR-2のtetherd ligand とともに添加したところ、それらの産生は抑制された。

(図 2)



3)子宮内膜間質細胞を培養し、調整した精子を添加したところ、 PAR-2 を介してMAPKであるERK、 p38およびJNKのリン酸化が認められた。また、これらの酵素はPAR-2 antagonistの添加でリン酸化が抑制された(図 3)。一方、 MAPKの下流にあるRSKやMSKもPAR-2 を介してリン酸化が認められた。これらも同様に、 PAR-2 antagonistの添加でリン酸化が抑制された。

(図 3)



今回の結果から、子宮内膜においてPAR-2 はMAPKを介して翻訳関連蛋白の制御により生理活性物質の産生を調節することが示された。また、精子はPAR-2を介して子宮内膜における細胞内情報伝達系の活性を制御することが示された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Kai Y, Kawano Y, et al.

The possible role for AMP-activated protein kinase (AMPK) by metformin and AICAR in granulosa cells.

Rerod Biol & Endocrinol 査読有
2015;13:27.

DOI 10.1186/s12958-015-0023-2

[学会発表](計 3 件)

1. 後藤香里、河野康志、他.

子宮内膜間質細胞の脱落膜化における protease activated receptor-1 (PAR-1) を介した妊娠維持への細胞内情報伝達経路における検討

第 33 回日本生殖免疫学会 2015 年 11 月 21 - 22 日 熊本県民交流館パレア (熊本県熊本市)

2. 河野康志、他.

子宮内膜間質細胞における AMP-activated protein kinase (AMPK) の役割

第18回日本生殖内分泌学会 2013年12月7日 シェーンバツハサパー (東京都千代田区)

3. 河野康志

不妊症に対する外科的治療法の最前線
子宮腔内病変に対する妊孕性温存を目指した治療戦略

第 58 回日本生殖医学会 2013 年 11 月 15 - 16 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

- (1)研究代表者: 河野康志

(KAWANO YASUSHI)

大分大学・医学部産科婦人科・准教授
研究者番号: 4 0 2 7 4 7 5 8

- (2)研究分担者: 榎原久司

(NARAHARA HISASHI)

大分大学・医学部産科婦人科・教授
研究者番号: 6 0 2 1 1 4 4 7

- (2)研究分担者: 奈須家栄

(NASU KAEI)

大分大学・医学部地域医療支援システム産
婦人科分野・教授
研究者番号: 3 0 2 7 4 7 5 7